



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

FLORE

Repository istituzionale dell'Università degli Studi di Firenze

Pigmenti clorofilliani per la stima della biomassa fotototrofa

Questa è la Versione finale referata (Post print/Accepted manuscript) della seguente pubblicazione:

Original Citation:

Pigmenti clorofilliani per la stima della biomassa fotototrofa / Lazzara L.; Bianchi F.; Massi L.; Ribera D'Alcalà M.. - STAMPA. - (2010), pp. 365-378.

Availability:

This version is available at: 2158/373990 since:

Publisher:

SIBM, ISPRA

Terms of use:

Open Access

La pubblicazione è resa disponibile sotto le norme e i termini della licenza di deposito, secondo quanto stabilito dalla Policy per l'accesso aperto dell'Università degli Studi di Firenze (<https://www.sba.unifi.it/upload/policy-oa-2016-1.pdf>)

Publisher copyright claim:

(Article begins on next page)



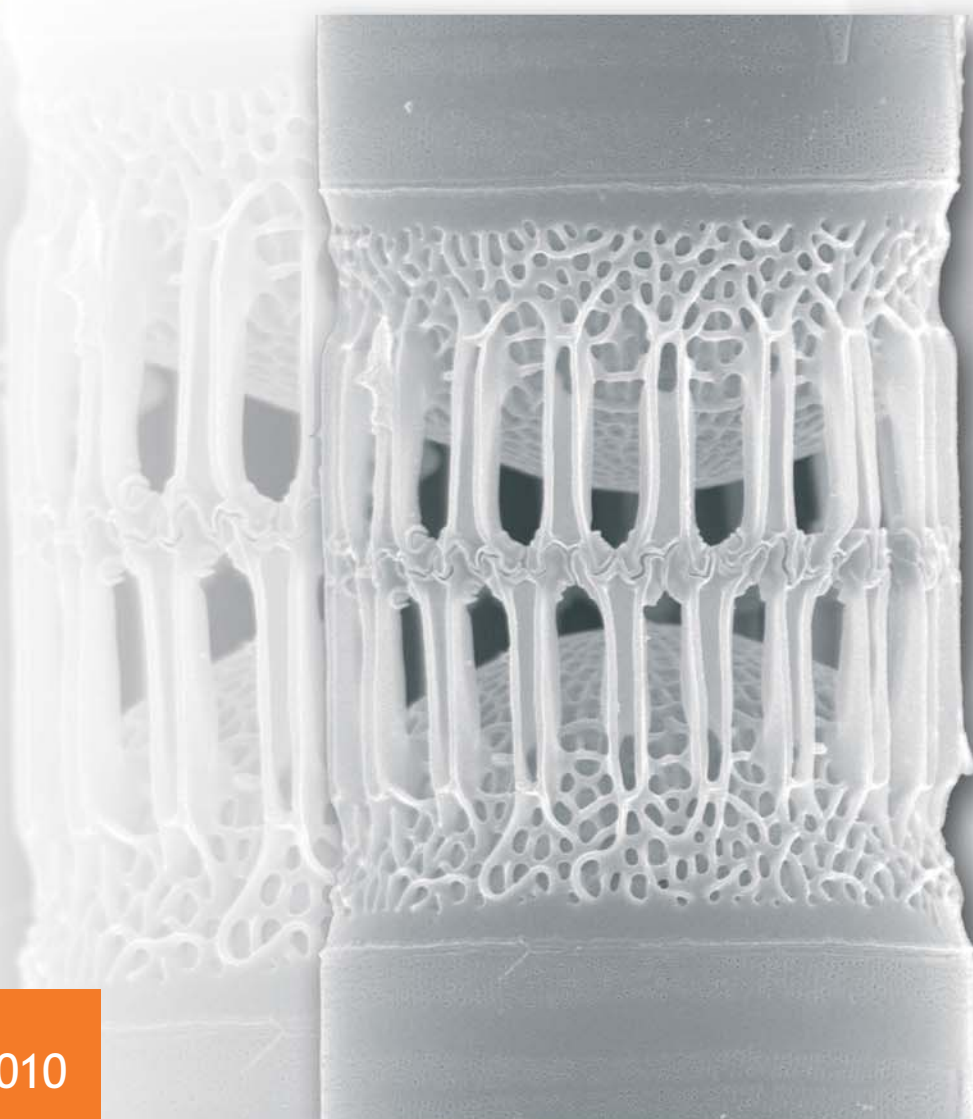
ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



Metodologie di studio del Plancton marino

MANUALI E LINEE GUIDA





ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale

Metodologie di studio del plancton marino

edito da

Giorgio Socal¹, Isabella Buttino², Marina Cabrini³, Olga Mangoni⁴,
Antonella Penna⁵, Cecilia Totti⁶

1 Istituto di Scienze Marine CNR, Venezia

2 Stazione Zoologica Anton Dohrn, Napoli - indirizzo corrente: ISPRA, Livorno

3 Istituto Nazionale di Oceanografia e Geofisica Sperimentale, Trieste

4 Dipartimento delle Scienze Biologiche, Sezione di Zoologia, Università degli Studi Federico II, Napoli

5 Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Sezione Biologia Ambientale, Università di Urbino

6 Dipartimento di Scienze del Mare. Università Politecnica delle Marche, Ancona

Gli editori e gli autori tutti dedicano questo volume alla memoria dei compianti
Elvezio Ghirardelli e Donato Marino

Manuali e Linee Guida 56/2010

Informazioni legali

L'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) e le persone che agiscono per conto dell'Istituto non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo manuale.

ISPRA – Istituto Superiore per la protezione e la ricerca ambientale
Via Vitaliano Brancati, 48 – 00144 Roma
www.isprambiente.it

ISPRA, Manuali e Linee Guida 56/2010

ISBN 978-88-448-0427-5

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica

ISPRA

Grafica di copertina: Franco Iozzoli

Foto di copertina: Foto al Microscopio elettronico a scansione della diatomea *Skeletonema japonicum* di Maria Saggiomo, eseguita presso la Stazione Zoologica Anton Dohrn di Napoli

Coordinamento tipografico:

Daria Mazzella

ISPRA - Settore Editoria

Amministrazione:

Olimpia Girolamo

ISPRA - Settore Editoria

Distribuzione:

Michelina Porcarelli

ISPRA - Settore Editoria

Impaginazione e Stampa

Tipolitografia CSR - Via di Pietralata, 157 - 00158 Roma

Tel. 064182113 (r.a.) - Fax 064506671

Finito di stampare giugno 2010

Premessa

È con vivo piacere che, al termine del mio mandato da Presidente della Società Italiana di Biologia Marina, vedo realizzata la pubblicazione di un volume tanto atteso dalla comunità scientifica italiana. Il vecchio Manuale del Plancton, dovuto all'impegno del caro socio Mario Innamorati, era stato superato non già nell'impostazione metodologica quanto piuttosto nei contenuti tecnici dovuti all'avanzamento delle conoscenze. Era quindi ora che venisse pubblicato un nuovo volume contenente tutto quanto occorre conoscere per poter effettuare ricerche di eccellenze sul plancton. E questa richiesta avanzata non soltanto da me in qualità di Presidente ma da tutto il Consiglio Direttivo della SIBM, ha trovato nell'amico e collega Giorgio Socal la persona adatta, capace di catalizzare le migliori competenze scientifiche nazionali nel comporre un'opera così maestosa ed indispensabile come questa. Il percorso della Società Italiana di Biologia Marina si corona pertanto di un nuovo traguardo raggiunto: dopo il prestigioso volume del Manuale del Benthos, di cui è stata redatta e pubblicata anche l'edizione in inglese, ora con questo volume sul plancton si può dire che la SIBM sia in grado di svolgere un ruolo non facilmente sostituibile a livello nazionale nel campo della Biologia Marina. Il testo appena prodotto sul Plancton rappresenta infatti il punto di riferimento per qualsiasi attività, dal monitoraggio alla ricerca, che vede coinvolta la comunità planctonica. Un grazie sentito va all'APAT, oggi ISPRA, che nelle persone del dott. G. Boeri e dell'Ing. S. Corsini *in primis*, hanno compreso l'importanza fondamentale di questa opera ed hanno pertanto deciso di contribuire in maniera sostanziale alla pubblicazione del volume che esce infatti a due nomi (ISPRA e SIBM).

Nell'augurarmi che ci possa essere a breve l'edizione inglese del presente volume, in grado di dare visibilità internazionale ai due Enti sopra citati che l'hanno prodotto, come Presidente SIBM termino ringraziando tutti gli Autori dei testi che hanno messo a disposizione dell'intera comunità scientifica nazionale le loro indiscusse competenze.

ANGELO TURSI
PRESIDENTE SIBM

Mi è particolarmente gradita l'occasione di presentare questa pubblicazione sulle **“Metodologie di studio del plancton marino”** a cura della SIBM che segue la prima pubblicazione a cui ISPRA ha partecipato: “Manuale sulle metodologie di campionamento e studio del benthos marino mediterraneo”.

Il presente manuale rappresenta un aggiornamento delle metodologie di monitoraggio attraverso nuove tecnologie applicate nella moderna oceanografia biologica, rivolta all'ambiente di mare aperto ed a quello costiero e di transizione e proposte a livello internazionale e offre un valido contributo allo studio del plancton marino.

Uno dei pregi di tale volume è quello di utilizzare testi facilmente interpretabili che favoriscono la riproducibilità delle metodologie di analisi, oltre a rappresentare un utile strumento sia per le istituzioni italiane di ricerca che studiano le problematiche legate all'ecologia del plancton marino, sia per gli enti locali quali regioni, ARPA, province e comuni, che svolgono attività di monitoraggio ad ampia scala spazio-temporale.

ING. EMILIO SANTORI
SUBCOMMISSARIO ISPRA

CAPITOLO 33. PIGMENTI CLOROFILLIANI PER LA STIMA DELLA BIOMASSA FOTOTROFA

L. Lazzara, F. Bianchi, L. Massi, M. Ribera d'Alcalà

33.1 INTRODUZIONE GENERALE AI METODI BASATI SUI PIGMENTI

L'obiettivo di questa sezione è descrivere i principali metodi biochimici e biofisici per la stima della biomassa fototrofa marina e di alcuni dei suoi aspetti funzionali. Questi metodi sono sostanzialmente complementari a quelli basati sui conteggi diretti o indiretti degli organismi ed i loro risultati si riferiscono a proprietà dell'intera comunità naturale o di alcune delle sue frazioni dimensionali.

I primi metodi proposti (fotometrico, fluorimetrico ed HPLC del capitolo 34) sono basati su una caratteristica comune a tutti gli organismi autotrofi, la presenza di pigmenti che permettono di catturare la luce per trasferirla ai centri di reazione dove ha inizio la fotosintesi. Nell'oceano attuale, tranne che per una piccola frazione di batteri molto antichi (Kolber *et al.*, 2001 e riferimenti ivi inclusi), tutti gli organismi fototrofi, ovvero quelli che usano la luce per vivere, posseggono o la clorofilla *a* o un pigmento molto simile, la divinil-clorofilla *a*, mentre i pigmenti accessori, per lo più carotenoidi, possono cambiare da gruppo a gruppo.

I metodi riportati in questo e nei prossimi due capitoli si basano sulla presenza ubiquitaria di un ristretto numero di pigmenti e sulla risposta da loro mediata alle stimolazioni luminose. Questi metodi si possono dividere in due gruppi: quelli che stimano la quantità di uno o più pigmenti presenti nella sospensione algale, dopo averli preliminarmente estratti con un solvente (metodi *in vitro*) e quelli che stimano indirettamente la loro quantità, misurando l'ampiezza della risposta ad un'eccitazione luminosa della sospensione cellulare (metodi *in vivo*, vedi Capitolo 35).

Ambedue si basano sull'evidenza che la quantità di pigmenti presenti in un organismo planctonico covariano con la sua biomassa totale. In particolare la quantità di clorofilla *a* contenuta in una cellula è proporzionale alla quantità di carbonio nella cellula stessa. Tuttavia tale rapporto di proporzionalità può variare fino a circa 10 volte in relazione alla specie, al suo stato fisiologico ed alla sua storia luminosa (tra gli altri Falkowski e Raven, 1997).

Ad esempio Anning *et al.* (2000) riportano per una diatomea coltivata in laboratorio (*Skeletonema costatum* clone CCMP 1332) un genere che produce intense fioriture costiere, una diminuzione del rapporto clorofilla-carbonio di quattro volte (da 0,08 a 0,02 g·g⁻¹), per sospensioni cresciute rispettivamente a 50 e 1200 µE m⁻² sec⁻¹. Quindi il non tenere conto della variazione del rapporto clorofilla-carbonio in ambienti naturali, può comportare differenze nella stima della biomassa fitoplanctonica se questa è basata sul dosaggio della clorofilla *a*, di almeno un fattore 3. Un'analisi di dettaglio della variazione del rapporto clorofilla-carbonio in differenti condizioni di crescita è stata condotta in numerosi studi, tra questi quello di Geider *et al.* (1998), che può essere preso come punto di partenza per un approfondimento.

Nonostante questi limiti va detto che, le specifiche caratteristiche di assorbimento dei pigmenti, che sono alla base del colore delle alghe, hanno consentito, da più di 40 anni nella maggior parte degli studi di ecologia acquatica, di dosare la clorofilla con metodi *in vitro* per la stima della biomassa planctonica. I metodi *in vivo*, d'altro canto, permettono anche di valutare tale biomassa dallo spazio, seguendone gli andamenti a scala globale e su intervalli di tempo giornalieri. Anche questo giustifica, se non altro a scopi di comparazione, la loro applicazione.

C'è da aggiungere inoltre che le metodiche utilizzate per la raccolta della biomassa fitoplanctonica (essenzialmente rappresentate dalla filtrazione) non consentono di separare il carbonio fitoplanctonico da quello non-fitoplanctonico (detrito organico), contemporaneamente presente nell'acqua marina.

Riassumendo, si può affermare che nonostante le misure di carbonio siano quelle più corrette per una

stima della biomassa fitoplanctonica, quelle basate sulla clorofilla risultano ancora le più utilizzate, sia per motivi storici che pratici. Infatti le prime, nonostante i recenti progressi tecnici, sono più costose e complicate di quelle dei pigmenti qui proposte.

Queste metodiche, sia fotometriche che fluorimetriche (vedi oltre), risultano ottimali quando si prevede un impegno economico e temporale limitato, mentre le recenti tecniche di separazione cromatografica della miscela pigmentaria (essenzialmente per HPLC: Robinson, 1979; Capitolo 34) prevedono costi e tempi molto superiori e non sempre sostenibili da tutti i laboratori. Inoltre, anche nel caso si adottino metodiche cromatografiche, è preferibile eseguire in parallelo queste misure dei pigmenti fitoplanctonici, in modo da assicurare la necessaria continuità con i dati pregressi e con gli algoritmi bio-ottici storici ed, eventualmente, estendere il numero dei campioni analizzati con tecniche molto meno costose ed impegnative (Trees *et al.*, 2003).

La grande diffusione del dosaggio spettrofotometrico è motivata anche dal fatto che lo strumento utilizzato (spettrofotometro) è quasi sempre presente in un laboratorio analitico, per le molteplici determinazioni basate sulla misura dell'assorbanza di sostanze colorate prodotte in maniera selettiva e quantitativa in presenza delle specie chimiche da dosare, ed è questo il motivo principale per cui il metodo viene riportato in questo manuale. La controindicazione del metodo spettrofotometrico è la sua ridotta sensibilità, rispetto ai metodi basati sulla fluorescenza. Questo comporta o l'uso di celle a maggiore cammino ottico (10 cm), che generano comunque il problema di disporre di un volume più alto di solvente per l'estrazione e di attendere la stabilizzazione della lettura, o la filtrazione di volumi di acqua maggiori. Questo non sempre è possibile dato che, in condizioni di acque blu (cioè in mare aperto ed in periodi diversi da quelli di fioriture intense), 4-5 l sono la quantità minima necessaria per ottenere risultati attendibili. Filtrare grandi volumi di acqua presenta sempre molte difficoltà, sia per il campionamento, che per l'incremento del tempo di filtrazione che per la necessità di utilizzare filtri di dimensioni maggiori e/o di apparati di filtrazione *ad hoc*.

Per converso, il metodo fluorimetrico permette di ottenere dati attendibili filtrando quantità di acqua minori, utilizzando filtri di diametro più piccolo e ottenendo volumi di estratto inferiori. Tutti questi aspetti rendono il dosaggio con la misura della fluorescenza complessivamente più pratico ed economico, escludendo l'acquisizione iniziale di un fluorimetro, sia esso a filtri che con monocromatore, anche se recentemente sono stati immessi sul mercato strumenti a costi accessibili, di poco superiori a quelli di uno spettrofotometro. Tuttavia è bene considerare che questi strumenti analitici si prestano ad un minor numero di applicazioni per analisi di tipo ambientale. Va ricordato infine che tutti i metodi di misura delle concentrazioni pigmentarie, incluse le tecniche HPLC e quelle fluorimetriche, si basano su calibrazioni che, necessariamente, utilizzano misure di densità ottica, il che rende insostituibile l'uso dello spettrofotometro.

Infine, per quanto nell'ambito di osservazioni sistematiche dell'ambiente, le misure di biomassa algale basate sulla clorofilla siano sempre più sostituite da misure automatiche o remote basate su sensori bio-ottici, il disporre di una consolidata procedura di dosaggio dei pigmenti clorofilliani è essenziale per ogni laboratorio che si occupi di ambiente marino. Questo sia per produrre dati di "verità-mare", che per ricondurre negli intervalli reali di variazione le misure basate su strumentazione ottica, che fornisce valori assoluti solo di grandezze ottiche, peraltro prodotte da pigmenti che sono organizzati in strutture attive, cellulari e subcellulari (vedi *package effect* in Capitolo 35).

33.2 CAMPIONAMENTO E FILTRAZIONE

33.2.1 Attrezzatura e reagenti

- Bottiglie in plastica scure, da 1 l (acque costiere) a 5 l (mare aperto)
- Retino da plancton con maglia di 250 µm

-
- Imbuto in plastica adatto per bottiglie
 - Apparato di filtrazione (per filtri con diametro da 25 o 47 mm)
 - Pompa da vuoto e trappola
 - Filtri in fibra di vetro Whatman GFF da 25 o 47 mm (consigliati)
 - Provette da centrifuga tarate da 10 ml
 - Congelatore o frigorifero
 - Spruzzetta o pipetta automatica per acetone
 - Cilindri graduati da 1 litro
 - Imbuto per filtrazione e carta da filtro
 - Acetone ppa [(CH₃)₂CO]
 - Carbonato di sodio anidro [Na₂CO₃]
 - Acetone neutralizzato: all'acetone puro (ppa) aggiungere carbonato di sodio anidro in eccesso ed agitare vigorosamente. Filtrare, dopo almeno 24 ore, su carta da filtro e travasare nella spruzzetta o bottiglia a chiusura ermetica.

33.2.2 Procedura di campionamento

Travasare il campione d'acqua dalle bottiglie di prelievo nelle bottiglie di plastica scura, interponendo il retino con maglie di 250 µm e riporre al fresco, lontano dai raggi solari. La prefiltrazione del campione ha lo scopo di trattenere lo zooplankton e frammenti di macroalghe eventualmente presenti (Strickland e Parsons, 1968; Lenz e Fritzsche, 1980).

33.2.3 Procedura di filtrazione

Filtrare i campioni prelevati con filtri in fibra di vetro, Whatman GF/F; è consigliabile effettuare la filtrazione entro breve tempo dal prelievo (max 1-2 ore), specialmente quando i campioni siano stati raccolti in ambienti eutrofici. Il filtro in fibra di vetro è meno soggetto ad intasamento ed è più economico del filtro a membrana sintetica ed i filtri GF/F vengono utilizzati anche per la loro elevata capacità di ritenzione, la facilità di omogeneizzazione e la versatilità di impiego in una serie di altre analisi che possono essere effettuate in parallelo sullo stesso campione (sostanza sospesa, produzione primaria, POC, analisi biochimiche varie, vedi i capitoli seguenti).

Qualora lo scopo sia stimare precise frazioni dimensionali del particolato, in sostituzione dei filtri in fibra di vetro si possono utilizzare filtri a base di membrane sintetiche (polycarbonato). Questi filtri, ad impronta di enucleazione, hanno il vantaggio di avere pori calibrati e quindi garantiscono una separazione molto precisa delle particelle secondo la taglia. Presentano però alcuni svantaggi, quali la scarsissima capacità di ritenzione (il flusso di filtrazione risulta molto più lento, rendendo necessario ripartire il campione su più filtri se si vuole accrescere la sensibilità del metodo), la loro scarsa omogeneizzazione (l'estrazione può avvenire, in questo caso, mediante shock osmotico), la possibilità di rilasciare in soluzione composti che assorbono nel visibile.

- Dopo aver collocato il filtro nell'apposito alloggiamento dell'apparato, bagnarli e far partire la pompa a vuoto con lieve depressione, così che aderisca uniformemente al supporto.
- Col cilindro graduato versare nell'imbuto dell'apparato di filtrazione un volume di campione, variabile tra 0,5 e 5 litri.
- Attivare la pompa da vuoto, assicurandosi che la differenza di pressione fra la parte inferiore e quella superiore del filtro non superi -25 KPa (circa 150 mm Hg), al fine di evitare la rottura delle cellule vegetali con la conseguente perdita di pigmenti.
- Alla fine della filtrazione, prosciugare il filtro, mantenendo la pompa in funzione ancora per qualche secondo, per evitare che una parte del materiale vada perduta. La quantità di acqua da filtrare di-

pende dalla concentrazione presunta dei pigmenti (in mare aperto per concentrazioni di clorofilla pari a circa $1 \mu\text{g l}^{-1}$ vanno filtrati generalmente circa 3 l di acqua di mare ed in acque costiere-lagunari, possono essere sufficienti 0,5 – 1 l).

Come detto in precedenza la filtrazione delle sospensioni algali deve essere eseguita con una differenza di pressione tra le due facce del filtro molto ridotta per minimizzare la rottura delle cellule stesse. Poiché la filtrazione con il metodo della depressione comporta l'uso di contenitori stagni in cui viene ridotta la pressione (le cosiddette trappole) che occasionalmente possono travasare il loro contenuto nel circuito di aspirazione dell'aria, incidente sperimentato dalla totalità degli operatori, è possibile utilizzare un sistema a sovrappressione. Ovvero mantenere la parte inferiore del filtro alla pressione ambientale, potendo canalizzare il filtrato sia in contenitori *ad hoc* per un suo possibile riutilizzo o verso uno scarico, e creare una leggera sovrappressione sull'acqua del campione. Considerando la bassa sovrappressione necessaria, anche una pompa di circolazione d'aria per un acquario è sufficiente. Cosa che dà il vantaggio di costi molto ridotti, della limitazione automatica della pressione, dell'uso di basse tensioni di alimentazione, sempre preferibile in operazioni con acqua di mare, e l'azzeramento del rischio di danneggiare la pompa. L'unica difficoltà consiste nella selezione di contenitori che garantiscano la tenuta alla sovrappressione applicata e nell'opportuno inserimento dei portagomme necessari all'ingresso dell'aria ed alla fuoriuscita del liquido: nel caso di filtrazione in pressione il supporto di filtrazione più accessibile è quello volante (Sweenex). È consigliabile utilizzare supporti di filtrazione che abbiano una valvola per la fuoriuscita dell'aria in modo da non limitare la superficie filtrante per la presenza di bolle d'aria e che vengano stretti con la rotazione di una ghiera indipendente dalla faccia superiore del supporto. Questo per evitare la lacerazione del filtro nella fase di montaggio o smontaggio del supporto. Il sistema di filtrazione in sovrappressione risulta alla fine molto più economico e facilmente trasportabile rispetto ai sistemi a depressione.

33.2.4 Conservazione dei campioni

La conservazione dei campioni risulta un punto critico della procedura analitica, che può determinare l'instaurarsi di processi di degradazione delle clorofille che comportano una loro sottostima (Rai e Marker, 1982). Di conseguenza è sempre preferibile eseguire l'estrazione e l'analisi dei pigmenti clorofilliani subito dopo la filtrazione del campione. Tuttavia, se ciò non fosse possibile, è necessario conservare il campione come indicato di seguito:

- immediatamente dopo la filtrazione riporre il filtro in una provetta da centrifuga con chiusura ermetica e aggiungere un volume noto di acetone puro neutralizzato tale da garantire la completa immersione del filtro (indicativamente 5 ml).
- conservare la provetta al buio a -20°C (o comunque a temperature comprese tra -20 e $+4^{\circ}\text{C}$) ponendo particolare attenzione alla ermeticità della chiusura.

La conservazione del materiale filtrato per un periodo di tempo che si prolunghi da pochi giorni a diverse settimane può avere un effetto negativo, comportando la degradazione dei pigmenti clorofilliani (Yanagi e Koyama, 1971; Blasco, 1973; Neveux, 1979; Lenz e Fritsche, 1980; Wood, 1985; Lazzara *et al.*, 1990; vedi inoltre Mantoura *et al.*, 2005 che riportano quanto ottenuto dallo SCOR Working Group 78; e Trees *et al.*, 2003).

Sono state utilizzate modalità alternative di conservazione dei filtri, che tuttavia vengono sconsigliate, quali la conservazione a -20°C previo congelamento dei filtri umidi o essiccati (Panella e Magazzù, 1978) o la tecnica di essiccazione e congelamento (*freeze-drying*) che secondo Lenz e Fritsche (1980), non dà risultati di conservazione soddisfacenti.

La conservazione della clorofilla *a*, nei campioni di microalghe raccolte su filtro, è stata finora argomento di un numero di studi assai esiguo, se consideriamo la diffusione della pratica di conservazione dei filtri, anche per tempi prolungati (Mantoura *et al.*, 2005). La quasi totalità degli studi risalgono a prima degli anni '80, non riguardano analisi separate dei pigmenti estratti e presentano spesso risultati

contrastanti (Marker *et al.*, 1980), così da non consentire di raccomandare con sicurezza alcuna pratica di congelamento.

Tuttavia, sono state eseguite allo scopo in questa occasione alcune nuove prove su diatomee coltivate, che hanno confermato le indicazioni già date in Lazzara *et al.* (1990) sulla forte perdita di clorofilla *a* in filtri congelati umidi e conservati in aria a -20°C; perdita del 19-20% dopo solo due settimane e del 41% dopo 120 giorni. Invece, filtri conservati nel solvente puro (acetone 100%) a -20°C non presentano variazioni statisticamente significative dopo 13 e dopo 28 giorni (-3% e -6% rispettivamente), ma queste lo divengono dopo 73 e 120 giorni (-11% e -30% rispettivamente).

Le prove condotte confermano quindi quanto già osservato da altri autori (Blasco, 1973; Nusch, 1980; Wood, 1985), che cioè sia da preferire la pratica di conservazione del filtro immerso in acetone e al freddo. Va osservato infine che la conservazione in acetone puro, dà migliori garanzie rispetto a quella in acetone al 90%, in quanto inibisce l'azione delle clorofillasi, il cui effetto è maggiore in ambiente acquoso (Barrett e Jeffrey, 1971; Jeffrey e Hallegraeff, 1980).

Si consiglia, in conclusione, di effettuare misure immediate sugli estratti oppure, nella impossibilità, la conservazione del filtro immerso nell'acetone puro a -20° o meglio a -80 °C solo per periodi inferiori al mese, o del filtro umido congelato in aria (tra -20° e -80°C) ma solo se per periodi inferiori alla settimana.

33.3 PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI

Dopo che il particellato sospeso contenente pigmenti liposolubili, è stato concentrato su di un filtro in fibra di vetro mediante una filtrazione eseguita in presenza di una leggera depressione, i pigmenti clorofilliani vengono estratti (insieme ai carotenoidi) a freddo dalle cellule, triturando ed omogeneizzando i filtri, immersi in una miscela di acetone ed acqua.

33.3.1 Attrezzature specifiche

- Centrifuga per provette da 12 mm di diametro, capace di raggiungere 4000 rpm, possibilmente refrigerata.
- Omogeneizzatore (*potter*) con pestello in vetro smerigliato o teflon.

33.3.2 Prodotti chimici e reagenti

- Acetone ppa [(CH₃)₂CO]
- carbonato di sodio [NaCO₃]
- acido cloridrico [HCl]
- Acetone neutro al 90% v/v: mescolare 100 ml di acqua grado reagente e 900 ml di acetone neutro (vedi sopra) separatamente misurati. Mantenere sempre la soluzione lontana dalla luce e in presenza di carbonato di sodio.
- Acido cloridrico 0,66 mol l⁻¹: versare lentamente sotto agitazione 55 ml di acido cloridrico concentrato (HCl 37% v/v) in 950 ml di acqua grado reagente.

33.3.3 Procedura

Triturare ed omogeneizzare il filtro, conservato in acetone puro, per un massimo di 2 min sciacquando più volte accuratamente il pestello dell'omogeneizzatore.

Tale operazione va condotta adoperando un volume di acetone uguale a quello dell'acetone puro usato per conservare il filtro. Siccome l'estratto finale deve essere in acetone al 90% e tenendo conto che il filtro trattiene acqua (per un filtro GFF da 47 mm circa 0,7 ml), generalmente ai 5 ml di acetone puro si aggiungono 5 ml di acetone al 90%).

Se il campione viene analizzato subito dopo la filtrazione, le operazioni di triturazione ed omogeneizzazione vanno eseguite direttamente con acetone al 90%. La omogeneizzazione del filtro mediante potter provoca un graduale riscaldamento del liquido di estrazione, con possibile parziale degradazione dei pigmenti. Questo inconveniente può essere limitato usando acetone freddo (4 °C) o ponendo la provetta in un becker con ghiaccio, in ogni caso contenendo l'operazione entro un tempo massimo di 2 minuti.

È possibile omogeneizzare il campione anche mediante triturazione manuale con bacchetta di vetro, direttamente all'interno della provetta usata per la conservazione; in questo caso è opportuno stimare quantitativamente quale sia la eventuale diminuzione di efficienza, rispetto alla triturazione strumentale.

L'uso degli ultrasuoni, infine, sembra non dare buoni risultati (Nusch, 1980) in quanto produce eccessivo riscaldamento dell'estratto.

La provetta accuratamente tappata con la sospensione ottenuta (10 ml di acetone al 90%) deve essere posta a 4°C al buio per 24h a completare l'estrazione. Centrifugare le provette chiuse per 10 minuti a 4000 rpm (o 3500 per 12 min, se non refrigerate).

33.4 SPETTROFOTOMETRIA SU ESTRATTI

Lo spettrofotometro da usare dovrebbe preferenzialmente essere munito di reticolo interferenziale ed una larghezza di banda 1-2 nm, con cellette da almeno 50 mm (preferibilmente 100 mm) di cammino ottico e di volume ridotto (max 7 ml). È importante che la lunghezza d'onda sia accuratamente regolata, per cui occorre effettuare frequenti controlli seguendo le indicazioni della casa costruttrice dell'apparecchiatura. Se si dispone di spettrofotometri con lampada a idrogeno o mercurio, si può ad esempio, controllare che la riga dell'idrogeno sia situata a 656 nm e quella del mercurio a 546 nm.

Con le nuove generazioni di spettrofotometri a reticolo di diodi, disponibili ormai a prezzi contenuti, le misure divengono anche più rapide perché, come chiarito nel seguito, il metodo richiede letture a diverse lunghezze d'onda che in un sistema a diodi vengono fatte simultaneamente. In aggiunta la nuova generazione di spettrofotometri dispone di porte per il collegamento con un PC che permette la memorizzazione dei dati in formato digitale e quindi immediatamente utilizzabili per i calcoli necessari alla stima delle concentrazioni.

33.4.1 Lettura e calcoli

Dopo la centrifugazione finale dell'estratto prelevare il sopranatante, mediante una pipetta o siringa, avvinare con una piccola quantità le cellette dello spettrofotometro e quindi riempirle.

Di seguito vengono indicate tre diverse metodiche di stima dei pigmenti fotosintetici:

- metodo per la stima della clorofilla *a* con feopigmenti (clorofeopigmenti);
- metodo per la stima separata delle clorofille *a*, *b* e *c*;
- metodo per la stima separata della clorofilla *a* e dei feopigmenti.

La prima metodica riportata comporta un errore di entità variabile, per la presenza sia di pigmenti accessori (clorofille *b* e *c*) che presentano una coda di assorbimento anche a 664 nm, che di feofitine e feoformidi, principali prodotti di degradazione delle clorofille. Tuttavia questo metodo è da preferire quando si desidera abbassare la soglia di sensibilità della stima (ad es. per concentrazioni inferiori agli 0,4 µg l⁻¹), in quanto consente una stima più "robusta" e attendibile della biomassa pigmentaria (vedi anche nota finale).

Le altre due metodiche consentono di ottenere una stima più precisa della sola clorofilla *a* in presenza di significative quantità di clorofilla *b* e *c*, utilizzando rispettivamente letture a più lunghezze d'onda (Jeffrey e Humphrey, 1975; Lorenzen e Jeffrey, 1980) oppure in presenza di significative quantità dei suoi prodotti di degradazione (feopigmenti), avendo trattato l'estratto con acido cloridrico (Lorenzen, 1967).

33.4.1.1 Concentrazione dei clorofeopigmenti

Questo metodo si basa sull'assunto che il picco di massimo assorbimento della clorofilla *a* si trova a 664 nm con coefficiente di assorbimento specifico di 87,67 cm²g⁻¹ (Jeffrey e Humphrey, 1975) ed i feopigmenti non siano presenti in elevate quantità.

Leggere allo spettrofotometro l'assorbanza del campione alle lunghezze d'onda di 664 e 750 nm contro un bianco di acetone (non neutralizzato) al 90%; qualora lo strumento preveda la contemporanea utilizzazione di più cellette, è necessario leggere il valore del bianco per ciascuna di esse, tenendone conto nella procedura di calcolo.

Calcolare la concentrazione dei clorofeopigmenti (Chl) applicando la seguente formula:

$$\text{Chl } (\mu\text{g l}^{-1}) = \{ [A(s,664) - A(b,664)] - [A(s,750) - A(b,750)] \} v \cdot 10^6 / (a^* \cdot co \cdot V)$$

dove:

A(s,664) = densità ottica del campione a 664 nm;

A(s,750) = densità ottica del campione a 750 nm;

A(b,664) = densità ottica del bianco a 664 nm;

A(b,750) = densità ottica del bianco a 750 nm;

a* = coefficiente di assorbimento specifico della clorofilla *a* in acetone 90% a 664 nm (87,67 cm²g⁻¹l);

co = cammino ottico della celletta (cm);

v = volume dell'estratto (ml);

V = volume di campione filtrato (ml).

33.4.1.2 Concentrazioni delle clorofille *a*, *b* e *c*

Questa metodica spettrofotometrica va usata per fornire stime accurate delle clorofille *a*, *b* e *c*₁ + *c*₂ su campioni fitoplanctonici di popolamenti misti, quando non sono presenti significative quantità dei loro prodotti di degradazione (Jeffrey e Welschmeyer, 2005; Humphrey e Jeffrey, 2005).

Leggere l'estratto in acetone, alle lunghezze d'onda di 630, 647, 664 e 750 nm, per stimare la concentrazione delle clorofille *b* e *c* e per determinare la loro incidenza sul valore della concentrazione della clorofilla *a* (Lorenzen e Jeffrey, 1980). Applicando questa metodica occorre leggere anche i valori del bianco alle varie e rispettive lunghezze d'onda.

Determinare l'assorbanza netta dell'estratto a ciascuna lunghezza d'onda [A(λ)] secondo la formula:

$$A(\lambda) = [A(s, \lambda) - A(b, \lambda)] - [A(s, 750) - A(b, 750)]$$

dove:

A(b,λ) = densità ottica del bianco alla λnm;

A(s, λ) = densità ottica del campione alla λnm;

A(b,750) e A(s,750) sono definite come sopra.

Calcolare le concentrazioni delle clorofille (Chl *a*, *b* e *c*) applicando le seguenti formule:

$$\text{Chl } a \text{ } (\mu\text{g dm}^{-3}) = [11,85 A(664) - 1,54 A(647) - 0,08 A(630)] v \cdot 10^3 / (co \cdot V)$$

$$\text{Chl } b \text{ } (\mu\text{g l}^{-1}) = [-5,43 A(664) + 21,03 A(647) - 2,66 A(630)] v \cdot 10^3 / (co \cdot V)$$

$$\text{Chl } c_1 + c_2 \text{ (}\mu\text{g l}^{-1}\text{)} = [-1,67 \cdot A(664) - 7,60 \cdot A(647) + 24,52 \cdot A(630)] \cdot v \cdot 10^3 / (\text{co} \cdot V)$$

dove:

$A(\lambda)$, co , v e V hanno il significato già sopra espresso.

I valori delle concentrazioni delle clorofille b e c possono risultare negativi quando questi pigmenti sono presenti in concentrazioni molto basse e non possono essere determinati con questo metodo (vedi nota successiva), oppure se sono presenti molti feopigmenti che disturbano la specificità delle letture.

33.4.1.3 Concentrazioni della clorofilla a e dei feopigmenti

Il metodo permette di determinare le concentrazioni della clorofilla a e dei feopigmenti (feofitine, feoforbidi, clorofillidi) assumendo che il rapporto tra i loro coefficienti di assorbimento specifico, sia uguale a quello tra clorofilla a e feofitina a (Lorenzen, 1967).

Sui campioni naturali questa tecnica fornisce i risultati migliori quando i prodotti di degradazione sono essenzialmente costituiti dalla feofitina a . Inoltre fornisce un range di errore potenziale variabile in relazione ai rapporti fra le concentrazioni di clorofilla a e feofitina a , permettendo una migliore stima della concentrazione della clorofilla a quando questo pigmento sia dominante rispetto alla feofitina. Al contrario quando i rapporti si invertono la stima dei feopigmenti sarà più accurata di quella della clorofilla a (Jeffrey e Welschmeyer, 2005; Lorenzen e Newton-Downs, 1986). Infine questo metodo, come del resto quello fluorimetrico descritto di seguito, soffre dell'interferenza della clorofilla b , che dopo acidificazione si degrada a feofitina b , non distinguibile dalla feofitina a , e stimata nei calcoli finali come feopigmento.

La procedura analitica prevede l'aggiunta di 50 mm³ di HCl (0,66 mol l⁻¹) per ogni 5 ml di estratto direttamente nella celletta dello spettrofotometro subito dopo le letture a 665 e 750 nm. La celletta va agitata ripetutamente ed occorre attendere da 30 a 60 sec prima di ripetere le letture alle stesse lunghezze d'onda. In questo modo, tutta la clorofilla a presente nell'estratto si converte in feofitina a . È importante tenere presente che la concentrazione finale dell'acido nell'estratto non deve superare di molto il valore di 3 10⁻³ mol l⁻¹ (30 mm³ di HCl 0,66 mol l⁻¹ per ogni ml di estratto), per evitare che i carotenoidi presenti si trasformino in un composto che assorbe nel rosso, alterando così il valore della lettura dei feopigmenti (Riemann, 1978).

Determinare l'assorbanza netta dell'estratto prima dell'acidificazione [$A(665o)$] e dopo acidificazione [$A(665a)$] secondo la formula:

$$A(665a) = [A(s, 665a) - A(b, 665a)] - [A(s, 750a) - A(b, 750a)]$$

dove:

$A(b, 665)$ = densità ottica del bianco a 665 nm ; $A(b, 750)$ = assorbanza del bianco a 750 nm;

$A(s, 665a)$ = densità ottica del campione a 665 nm prima ($a=o$) o dopo acidificazione ($a=a$);

$A(s, 750a)$ = densità ottica del campione a 750 nm prima ($a=o$) o dopo acidificazione ($a=a$).

Calcolare quindi le concentrazioni della clorofilla a (Chl a) e dei feopigmenti applicando le seguenti formule:

$$\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{g l}^{-1}\text{)} = 26,73 [A(665o) - A(665a)] \cdot v \cdot 10^3 / (\text{co} \cdot V)$$

$$\text{Feopigmenti (}\mu\text{g l}^{-1}\text{)} = 26,73 [1,7 A(665a) - A(665o)] \cdot v \cdot 10^3 / (\text{co} \cdot V)$$

dove:

$A(665o)$ = densità ottica netta del campione a 665 nm prima dell'acidificazione;

$A(665a)$ = densità ottica netta del campione a 665 nm dopo acidificazione;

co , v e V hanno il significato già sopra espresso.

33.4.2 Note sui dosaggi spettrofotometrici

- Il dosaggio spettrofotometrico con strumenti a reticolo interferenziale ha un intervallo ottimale di lettura, rispetto all'errore di misura, compreso tra 0,2 e 0,8 unità di assorbanza (Strickland e Parsons, 1968). La concentrazione minima di clorofilla *a* che, utilizzando cellette da 100 mm di cammino ottico, il metodo consentirebbe di dosare nell'estratto è di 228 $\mu\text{g l}^{-1}$, che equivale ad una concentrazione *in situ* di 0,46 $\mu\text{g l}^{-1}$, nel caso siano stati filtrati 5 l di campione. Tuttavia, se le condizioni ottiche della misura e l'accuratezza sono soddisfacenti ($\pm 0,002 A$), si hanno letture valide anche con assorbanze, a 664 nm, di 0,050 (Neveux, 1979) corrispondente *in situ* a 0,11 $\mu\text{g Chl } a \text{ l}^{-1}$.
- Se l'assorbanza dei bianchi supera il valore di 0,008 occorre pulire accuratamente l'esterno delle cellette e nel caso il valore delle letture sia ancora elevato, è necessario immergere le cellette stesse in miscela solfocromica per 10 minuti e sciacquarle poi abbondantemente con acqua prima di ripetere la lettura. Qualora l'assorbanza non diminuisca, verificare che il disturbo non sia dovuto ad impurezze presenti nell'acetone e nel caso filtrarlo accuratamente.
- La lettura a 750 nm dà una stima della torbidità del campione e non deve superare il valore di 0,010 di assorbanza (cioè 0,002 per ogni cm di cammino ottico); in caso contrario è necessario ripetere la centrifugazione o filtrare il campione con una siringa munita di supporto "Sweenex" nel quale sia inserito un filtro in teflon di 13 mm di diametro e con porosità di 0,2 μm .

33.5 SPETTROFLUORIMETRIA SU ESTRATTI

La stima della concentrazione di clorofilla *a* e feopigmenti con i metodi fluorimetrici si basa sulla misura della fluorescenza dei pigmenti in estratto acetonicco, prima e dopo acidificazione con acido cloridrico. Si misura così la frazione fotosinteticamente attiva (clorofilla *a*) ed inattiva (feopigmenti) dei pigmenti clorofilliani presenti (Yentsch e Menzel, 1963; Holm-Hansen *et al.*, 1965). Rispetto a quelli spettrofotometrici i metodi fluorimetrici risultano più sensibili, precisi e rapidi, tuttavia l'uso è consigliato solo quando la concentrazione dei pigmenti è bassa, poiché, per valori elevati, la relazione tra fluorescenza e concentrazione non è più lineare. Il limite superiore entro il quale la relazione si mantiene tale è di ca. 750 $\mu\text{g l}^{-1}$ nell'estratto acetonicco (Neveux, 1979) e di ca. 1,5 $\mu\text{g l}^{-1}$ nell'acqua di mare (Bianchi, 1986). In ogni caso, tale intervallo di linearità va verificato per ciascuno strumento. Inoltre la validità di questi metodi è fortemente condizionata dalla eterogeneità della miscela di pigmenti, in particolare dalla concentrazione di clorofilla *b* nell'estratto acetonicco (Yentsch, 1965; Loftus e Carpenter, 1971; Gibbs, 1979). Infatti la feofitina *b* prodotta dalla degradazione di questo pigmento mostra un picco di emissione a 651 nm che, inversamente a quello delle feofitine *a* e *c*, presenta un forte aumento rispetto alla corrispondente clorofilla, causando quindi, se presente, una sovrastima dei feopigmenti.

Non è da sottovalutare infine, la presenza nei campioni, di altri composti che fluorescono nel rosso, poiché possono condurre a stime erronee di clorofilla e feopigmenti.

Per ovviare a ciò, sono stati proposti numerosi metodi di analisi per via fluorimetrica, che affinano la selezione spettrale con tecniche abbastanza complesse: Loftus e Carpenter (1971) utilizzano in successione tre filtri di emissione per selezionare differenti lunghezze d'onda; Boto e Bunt (1978) quantificano le clorofille *a*, *b* e *c* e loro rispettive feofitine utilizzando 5 letture ad altrettante coppie di valori di eccitazione ed emissione; Neveux e Panouse (1987) incrementano a 6 le combinazioni di eccitazione ed emissione durante le letture fluorimetriche. Più recentemente Moberg *et al.* (2001) hanno utilizzato analisi multivariate applicate alle matrici di eccitazione-emissione per identificare i costituenti principali della miscela pigmentaria di campioni di fitoplancton. Tuttavia, l'esame approfondito di questi metodi esula dagli scopi di questo manuale, poiché essi risultano improponibili per le analisi di routine dei pigmenti fotosintetici fitoplanctonici.

33.5.1 Attrezzature specifiche

- *Spettrofotometro*, vedi considerazioni nei precedenti paragrafi;
- *Fluorimetro a filtri o spettrofluorimetro*.

Nel caso si adoperi un fluorimetro a filtri, si raccomanda di usare come fonte luminosa una lampada F474-BL, un filtro di eccitazione Corning CS.5-60 o Kodak Wratten 47B e un filtro di emissione Corning CS.2-64. Lo strumento deve essere dotato di fotomoltiplicatore con sensibilità estesa alla banda degli 800 nm (ad es. Hamamatsu R446). Anche nel caso in cui si effettuino le misure con uno spettrofluorimetro, è necessario utilizzare un fotomoltiplicatore con sensibilità estesa nella regione del rosso. Inoltre è necessario calibrare/controllare le lunghezze d'onda dei monocromatori; la calibrazione più semplice consiste nella scansione in emissione di un campione di acqua deionizzata, ponendo il monocromatore di eccitazione a 350 nm: il picco massimo (detto "picco Raman dell'acqua") deve risultare a 397 ± 2 nm. Come ampiezza di banda passante, la regolazione consigliata è di 4-5 nm in eccitazione e di 10 nm in emissione.

33.5.2 Procedura

Le principali tappe del metodo fluorimetrico (Yentsch e Menzel, 1963; Holm-Hansen *et al.*, 1965) sono le seguenti.

33.5.2.1 Filtrazione, conservazione ed estrazione

Filtrare i campioni ed estrarre i pigmenti come già indicato nei precedenti paragrafi 2.3, 2.4 e 3.

33.5.2.2 Misure fluorimetriche

Dopo la chiarificazione dell'estratto (vedi paragrafo 3.3):

- trasferire gli estratti in cuvette da fluorimetria;
- effettuare le letture con spettrofluorimetro ai massimi delle lunghezze d'onda propri della clorofilla *a*, ($\lambda_{exc} = 430$ nm, $\lambda_{ems} = 665$ nm);
- condurre su ogni campione due letture fluorimetriche: i) F_o : lettura del campione tal quale; ii) F_a : lettura del campione dopo aggiunta di 1 goccia di una soluzione di HCl 1N;
- annotare il range di fluorescenza in cui sono compresi tutti i campioni misurati.

33.5.2.3 Preparazione dello standard iniziale

- preparare una soluzione standard di clorofilla *a* commerciale pura (soluzione madre) sciogliendo lo standard, fornito in forma cristallina, in una soluzione di acetone 90% (v/v);
- leggere la densità ottica di tale soluzione con uno spettrofotometro (in genere si ottiene un'assorbanza a 664 nm pari a circa 0,09 unità con celletta da 10 mm),
- calcolare la concentrazione della soluzione madre (in mg/l) mediante la seguente equazione:

$$\text{Chl } a_{\text{std}} (\mu\text{g/l}) = [A(664) - A(750)] \cdot (a^* \cdot \text{CO})^{-1} \cdot 10^6$$

dove:

$A(664)$ = densità ottica a 664 nm;

$A(750)$ = densità ottica a 750 nm;

a^* = coefficiente di assorbimento specifico della clorofilla *a* in acetone 90% a 664 nm ($87,67 \text{ cm}^{-1}\text{g}^{-1}$);

CO = cammino ottico della cuvetta, in cm.

- se possibile eseguire una scansione prima (SPT_o) e dopo (SPT_a) acidificazione della soluzione

- madre, ottenuta con una goccia di HCl 1N; salvare gli spettri ottenuti, annotandone i massimi di eccitazione e di emissione (vedi punto 5.2.2.b);
- verificare la congruità degli spettri con quelli propri della clorofilla *a* e della feofitina *a* riportati in letteratura, ripetere queste scansioni frequentemente per verificare l'eventuale esistenza di processi degradativi in atto nella soluzione standard;
 - per verificare la linearità della risposta strumentale, preparare una serie di substandards per un ambito di tre ordini di grandezza, utilizzando pipette automatiche o vetreria tarata, con diluizioni 1:2 in successione;
 - porre le lunghezze d'onda dello spettrofluorimetro ai massimi già verificati di eccitazione e di emissione della clorofilla *a* ($\lambda_{exc} = 430 \text{ nm}$, $\lambda_{ems} = 665 \text{ nm}$);
 - seguendo le stesse modalità di lettura dei campioni, per ciascun substandard eseguire una lettura prima (F_o) e dopo (F_a) acidificazione ;
 - preparare una tabella contenente le diluizioni effettuate, le concentrazioni ottenute, la fluorescenza letta prima (F_o) e dopo (F_a) l'acidificazione ;
 - portare le coppie di valori concentrazione/fluorescenza su un grafico x-y; si noterà una relazione lineare ai bassi valori ed una perdita di linearità ai valori più elevati, causata da fenomeni di autoassorbimento (*self-quenching*) presenti nelle molecole di composti fluorescenti, come le clorofille (Lakowicz, 2006);
 - è necessario che ciascun operatore annoti il limite oltre il quale si perde la linearità per il proprio strumento;
 - qualora i campioni discreti mostrino valori di fluorescenza oltre questo valore, diluire il campione per riportarlo nel *range* di linearità della risposta strumentale.

33.5.2.4 Standardizzazione di routine dopo la misura fluorimetrica dei campioni

- dopo ciascun lotto di analisi, a partire dalla soluzione madre, preparare una serie di 3-5 substandards tramite diluizioni, che cadano entro il range di fluorescenze ottenute dalle letture dei campioni;
- per ciascun substandard eseguire una lettura prima (F_o) e dopo (F_a) acidificazione con HCl.

33.5.2.5 Calcoli delle concentrazioni dei campioni

- calcolare il fattore C, media dei rapporti tra le 3-5 concentrazioni di ogni substandard (C_a) ed i relativi valori di fluorescenza prima dell'acidificazione (F_o) (paragrafo 5.2.4);
- calcolare il fattore R, come media dei rapporti tra F_o e F_a per ciascuno dei 3-5 substandards misurati (paragrafo 5.2.4);
- calcolare le concentrazioni della clorofilla *a* e dei feopigmenti a partire dalle misure del paragrafo 5.2.2, utilizzando le seguenti equazioni proposte da Holm-Hansen *et al.* (1965).

$$\text{Chl } a \text{ } (\mu\text{g l}^{-1}) = R (R-1)^{-1} C (F_o-F_a) v V^{-1}$$

$$\text{Feofitina } a \text{ } (\mu\text{g l}^{-1}) = R (R-1)^{-1} C [(R F_a)-F_o] v V^{-1}$$

dove:

- R = F_o/F_a medio;
 C = $C(\text{Chl})/F_o$ medio;
 F_o = fluorescenza del campione tal quale;
 F_a = fluorescenza del campione dopo acidificazione;
 v = volume dell'estratto (ml);
 V = volume di campione filtrato (ml).

33.6 BIBLIOGRAFIA

- ANNING T., MACINTYRE H.L., PRATT S.M., SAMMES P.J., GIBB S., GEIDER R.J. (2000) - Photoacclimation in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Limnol. Oceanogr.*, **45**: 1807-1817.
- BARRETT J., JEFFREY S.A. (1971) - A note on the occurrence of chlorophyllase in marine algae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **7**: 255-262.
- BIANCHI F. (1986) - Relazioni fra misure di clorofilla in Adriatico settentrionale. *Arch. Oceanogr. Limnol.*, **20**: 287-292.
- BLASCO D. (1973) - Estudio de las variaciones de la relacion fluorescencia in vivo chl a, y su aplicacion en oceanografia. Influencia de la limitacion de diferentes nutrientes, efecto del dia y noche y dependencia de la especie estudiada. *Inv. Pesq.*, **37**: 533-536.
- BOTO K.G., BUNT J. S. (1978) - Selective excitation fluorometry for the determination of chlorophylls and pheophytins. *Anal. Chem.*, **50**: 392-395.
- FALKOWSKI P.G., RAVEN J. (1997) - *Aquatic Photosynthesis*. Blackwell Science, Oxford: 375 pp.
- GEIDER R.J., MACINTYRE H.L., KANA T.M. (1998) - A dynamic regulatory model of phytoplanktonic acclimation to light, nutrients, and temperature. *Limnol. Oceanogr.*, **43**: 679-694.
- GIBBS C.F. (1979) - Chlorophyll *b* interference in the fluorometric determination of chlorophyll *a* and phaeopigments. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, **30**: 597-606.
- HOLM-HANSEN O., LORENZEN C.J., HOLMES R.W., STRICKLAND J.D.H. (1965) - Fluorimetric determination of chlorophyll. *J. Cons. Int. Explor. Mer.*, **30**: 3-15.
- HUMPHREY G.F., JEFFREY S.W. (2005) - Test of accuracy of spectro-photometric equations for the simultaneous determination of chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂. In: Jeffery S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. (eds), *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. 2nd ed. SCOR UNESCO, Paris: 616-621.
- JEFFREY S.W., HALLEGRAEFF G.M. (1980) - Studies of phytoplankton species and photosynthetic pigments in a warm core eddy of the East Australian Current. II A note on pigment methodology. *Mar. Ecol.*, **3**: 295-301.
- JEFFREY S.W., HUMPHREY G.F. (1975) - New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, **167**: 191-194.
- JEFFREY S.W., WELSCHMEYER N.A. (2005) - Spectrophotometric and fluorometric equations in common use in oceanography. In: Jeffery S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. (eds), *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. 2nd ed. SCOR UNESCO, Paris: 597-615.
- KOLBER Z.S., GERALD PLUMLEY F., LANG A.S., BEATTY T.J., BLANKENSHIP R.E., VANDOVER C.L., VETRIANI C., KOBLIZEK M., RATHGEBER C., FALKOWSKI P.G. (2001) - Contribution of Aerobic Photoheterotrophic Bacteria to the Carbon Cycle in the Ocean. *Science*, **292**: 2492-2495.
- LAKOWICZ J. R. (2006) - *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd ed. Springer, Berlin: 954 pp.
- LAZZARA L., BIANCHI F., FALCUCCI M., HULL V., MODIGH M., RIBERA D'ALCALÀ M. (1990) - Pigmenti clorofilliani. In: Innamorati M., Ferrari I., Marino D., Ribera d'Alcalà M. (eds), *Metodi nell'ecologia del plancton marino*. Nova Thalassia, LINT, Trieste: 207-223.
- LENZ J., FRITSCHÉ P. (1980) - The estimation of chlorophyll *a* in water samples: a comparative study on retention in a glass-fibre and membrane filter and on the reliability of two storage methods. *Arch. Hydrobiol. Beih.*, **14**: 46-51.
- LOFTUS M.E., CARPENTER J.H. (1971) - A fluorometric method for determining chlorophylls *a*, *b* and *c*. *J. Mar. Res.*, **29**: 319-338.
- LORENZEN C.J. (1967) - Determination of chlorophyll and phaeopigments spectro-photometric equations. *Limnol. Oceanogr.*, **12**: 343-346.
- LORENZEN C.J., JEFFREY S.W. (1980) - Determination of chlorophyll in sea water. *UNESCO Tech. Pap. Mar. Sci.*, **35**: 1-20.
- LORENZEN C.J., NEWTON-DOWNS J. (1986) - The specific absorption co-efficient of chlorophyllide *a* and phaeophorbide *a* in 90 % acetone, and comments on the fluorometric determination chlorophyll and phaeopigments. *Limnol. Oceanogr.*, **31**: 449-459.
- MANTOURA R.F.C., WRIGHT S.W., BARLOW R.G., CUMMINGS D.E. (2005) - Filtration and storage of pigments from microalgae. In: Jeffery S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. (eds), *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. 2nd ed. SCOR UNESCO, Paris: 283-305.
- MARKER A.F.H., NUSCH E.A., RAI H., RIEMANN B. (1980) - The measurement of photosynthetic pigments

-
- in fresh waters and standardization of methods: conclusions and recommendations. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.*, **14**: 91–106.
- MOBERG L., ROBERTSSON G., KARLBERG B. (2001) - Spectrofluorimetric determination of chlorophylls and pheopigments using parallel factor analysis. *Talanta*, **54**: 161-170.
- NEVEUX J. (1979) - Pigments chlorophylliens. In: Jacques G. (ed), *Phytoplankton, Biomasse, Production, Numeration et Culture*. Edition du Castellet, Perpignan: 1-107.
- NEVEUX J., PANOUSE M. (1987) -Spectrofluorimetric determination of chlorophylls and phaeophytins. *Arch. Hydrobiol.*, **109**: 567-581.
- NUSCH E. (1980) - Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Arch. Hydrobiol. Beih.*, **14**: 14-35.
- PANELLA S., MAGAZZÙ G. (1978) – Analisi dei pigmenti fitoplanctonici. In: Magazzù G. (ed.), *Metodi per lo studio del plancton e della produzione primaria*. Edizioni GM: 19-33.
- RAI H., MARKER A.F.M. (1982) - The measurements of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods. *Arch. Hydrobiol. Beih.*, **16**: 1-130.
- RIEMANN B. (1978) - Carotenoid interference in the spectrophotometric determination of chlorophyll degradation products from natural population of phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **23**: 1059-1066.
- ROBINSON A.L. (1979) - HPLC: the new king of analytical chemistry. *Science*, **203**: 1329-1332.
- STRICKLAND J.D.H., PARSONS T.R. (1968) - A Practical Handbook of Seawater Analysis. *Bull. Fish. Res. Bd. Can.*, **167**: 1-310.
- TREES C.C., BIDIGARE R.R., KARL D.M., VAN HEUKELEM L. (2003) – Fluorometric Chlorophyll *a*: Sampling, Laboratory Methods, and Data Analysis Protocols. In: Muller J.L., Fargion G., McClain C.R. (eds), *Ocean Optics Protocols For Satellite Ocean Color Sensor Validation*, Rev. 5, NASA/TM-2003: 15-25.
- WOOD L.W. (1985) - Chloroform-methanol extraction of chlorophyll *a*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **42**: 38-43.
- YANAGI K, KOYAMA T. (1971) -Thin layer chromatographic method for determining plant pigments in marine particulated matter, and ecological significance of the results. *Geochem. J.*, **5**: 23-37.
- YENTSCH C.S. (1965) - Distribution of chlorophyll and phaeophytine in the open ocean. *Deep Sea Res.*, **12**: 653-666.
- YENTSCH C.S., MENZEL D.W. (1963) - A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytine by fluorescence. *Deep Sea Res.*, **10**: 221-231.



ISBN 978-88-448-0427-5



9 788844 804275